

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003175

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-050083  
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

09. 3. 2005

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 2月25日

出願番号  
Application Number: 特願2004-050083

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

JP2004-050083

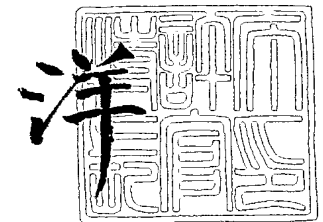
出願人  
Applicant(s):

国立大学法人岐阜大学  
独立行政法人産業技術総合研究所  
松下環境空調エンジニアリング株式会社

2005年 4月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 8009150036  
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願  
【提出日】 平成16年 2月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岐阜県岐阜市柳戸 1 - 1 岐阜大学農学部内  
    【氏名】 高見澤 一裕  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所  
    つくばセンター内  
    【氏名】 岩橋 均  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府吹田市垂水町 3 丁目 2 8 番 3 3 号 松下環境空調エンジニアリング株式会社内  
    【氏名】 伊藤 善孝  
【特許出願人】  
    【持分】 40/100  
    【識別番号】 391012257  
    【氏名又は名称】 岐阜大学長  
【特許出願人】  
    【持分】 35/100  
    【識別番号】 301021533  
    【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所  
【特許出願人】  
    【持分】 25/100  
    【識別番号】 591261336  
    【氏名又は名称】 松下環境空調エンジニアリング株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 110000040  
    【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ  
    【代表者】 池内 寛幸  
    【電話番号】 06-6135-6051  
【持分の割合】 25/100  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 139757  
    【納付金額】 5,250円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

テトラクロロエチレン (PCE) およびトリクロロエチレン (TCE) の少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境の生物活性判定方法であって、環境試料から抽出した核酸を遺伝子増幅方法により増幅してターゲットとし、前記ターゲットを前記有機塩素化合物の分解関連バクテリアに特有の塩基配列からなる DNA プローブの少なくとも 1 つとハイブリダイズさせることで前記環境中の前記バクテリアを検出し、検出された前記バクテリアの前記有機塩素化合物およびその脱塩素化物に対する分解能力に基づき、前記環境の前記有機塩素化合物の除去能力を判定することを特徴とする環境の生物活性判定方法。

## 【請求項 2】

前記有機塩素化合物分解関連バクテリアが、下記 A から R からなる群から選択される少なくとも 1 種を含む嫌気性バクテリアである請求項 1 に記載の生物活性判定方法。

- A: デハロスピリウム マルチヴォボランス (Dehalospirillum multivorans)  
B: デスルフィトバクテリウム フラピエリ (Desulfitobacterium frappieri)  
C: アクチノマイセタレス Sm-1 (ロドコッカス sp. Sm-1) (Actinomycetales Sm-1 (Rhodococcus sp. Sm-1))  
D: ロドコッカス ロドコッカス (Rhodococcus rhodococcus)  
E: キサントバクター フラバス (Xanthobacter flavus)  
F: マイコバクテリウム L1 (Mycobacterium L1)  
G: デスルフォミクロビウム ノルベギカム (デスルフォヴィブリオ バキュラタス) (Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus))  
H: デスルフィトバクテリウム デハロゲナンス (Desulfitobacterium dehalogenans)  
I: デスルフィトバクテリウム ハフニエンス (Desulfitobacterium hafniense)  
J: クロストリジウム フォルミコアセチカム (Clostridium formicoaceticum)  
K: デスルフロノナス クロロエテニカ (Desulfuromonas chloroethenica)  
L: アセトバクテリウム ウッディ DSM 1030 (Acetobacterium woodii DSM 1030)  
M: デハロバクター レストリクタス (Dehalobacter restrictus)  
N: デスルフィトバクテリウム sp. PCE1 (Desulfitobacterium sp. strain PCE1)  
O: デスルフィトバクテリウム フラピエリ TCE1 (Desulfitobacterium frappieri TC E1)  
P: アセトバクテリウム ウッディ DSM 2396 (Acetobacterium woodii DSM 2396)  
Q: デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1)  
R: デハロコッコイデス エタノジェネス 195 (Dehalococcoides ethenogenes 195)

## 【請求項 3】

前記 J、L および P の少なくとも 1 種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE を TCE に分解する能力を有すると判定する請求項 1 または 2 に記載の生物活性判定方法。

## 【請求項 4】

前記 A、G および M の少なくとも 1 種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE をシス型ジクロロエチレン (cisDCE) に分解する能力を有すると判定する請求項 1 から 3 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

## 【請求項 5】

前記 B、I、H、N、O および Q の少なくとも 1 種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE および TCE を cisDCE に分解する能力を有すると判定する請求項 1 から 4 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

## 【請求項 6】

前記 K のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE および TCE を DCE に分解する能力を有すると判定する請求項 1 から 5 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

## 【請求項 7】

前記 R のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE、TCE、DCE および ビニルクロライド (VC) をエテンに分解する能力を有すると判定する請求項 1 から 6 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

【請求項 8】

前記 C、D および E の少なくとも 1 種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、DCE および VC を二酸化炭素に分解する能力を有すると判定する請求項 1 から 7 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

【請求項 9】

前記 F のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、VC を二酸化炭素に分解する能力を有すると判定する請求項 1 から 8 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

【請求項 10】

前記 A から R のバクテリアに特有の塩基配列からなる DNA プローブが、下記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる請求項 2 から 9 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

(1) 配列番号 1 から 17 および配列番号 19 から 105 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(2) 前記 (1) のポリヌクレオチドの塩基配列の 1 個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記 (1) のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3) 前記 (1) のポリヌクレオチドの塩基配列の 1 個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記 (1) のポリヌクレオチドとの相同性が 90% 以上であるポリヌクレオチド。

(4) 前記 (1) から (3) のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記バクテリア A を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 1 および配列番号 19 から 25 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 12】

前記バクテリア B を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 2 および配列番号 26 から 30 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 13】

前記バクテリア C を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 3 および配列番号 31 から 35 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 14】

前記バクテリア D を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 4 および配列番号 36 から 40 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 15】

前記バクテリア E を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 5 および配列番号 41 から 45 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 16】

前記バクテリア F を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 6 および配列番号 46 から 48 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 17】

前記バクテリア G を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 7 および配列番号 49 から 53 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 18】

前記バクテリア H を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 8 および配列番号 54 から 57 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 19】

前記バクテリア I を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 9 および配列番号 58 から 62 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 20】

前記バクテリア J を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 10 および配列番号 63 から 68 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 21】

前記バクテリア K を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 11 および配列番号 69 から 74 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 22】

前記バクテリア L を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 12 および配列番号 75 から 79 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 23】

前記バクテリア M を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 13 および配列番号 80 から 86 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 24】

前記バクテリア N を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 14 および配列番号 87 から 91 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 25】

前記バクテリア O を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 15 および配列番号 92 から 96 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 26】

前記バクテリア P を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 16 および配列番号 97 から 99 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 27】

前記バクテリア Q を検出するための DNA プローブが、前記 (1) の配列番号が配列番号 17 および配列番号 100 から 105 のいずれかである前記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチドからなる DNA プローブである請求項 10 に記載の生物活性判定方法。

【請求項 28】

前記汚染された環境が、土壌、地下水、池および海水の少なくとも 1 つである請求項 1 から 27 のいずれかに記載の生物活性判定方法。

【請求項 29】

PCE および TCE の少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境のバイオレメディエーションの方法であって、請求項 1 から 28 のいずれかに記載の方法により前記環

境の生物活性判定方法を行う工程と、前記有機塩素化合物分解関連バクテリアが検出された場合に、前記バクテリアの増殖および活性の少なくとも一方を促進して前記有機塩素化合物またはその脱塩素化物の分解を促進する工程を含むバイオレメディエーションの方法。

**【書類名】 明細書****【発明の名称】** バイオレメディエーションサイトの生物活性判定方法**【技術分野】****【0001】**

本発明は、バイオレメディエーションサイトの生物活性判定方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

テトラクロロエチレン（PCE）およびトリクロロエチレン（TCE）をはじめ、各種の有機塩素化合物による地下水や土壌の汚染は、世界共通の深刻な問題であり、しばしば、新聞紙上等のマスコミでも詳細に取り上げられ、これらの物質による環境汚染を修復するための技術開発が社会的に強く要求されている。

**【0003】**

汚染環境修復技術として、物理化学的方法と生物的方法とがあげられるが、低濃度汚染の修復には、微生物を用いる生物的環境修復方法（バイオレメディエーション）が特に適している。バイオレメディエーションは、土壌の掘削が必要なく、建造物下の環境修復も容易であること、低コストで環境負荷が少ないことから、その実用化への期待が大きい。

**【0004】**

バイオレメディエーションの方式には、汚染された土壌や地下水に元来生息する微生物に、例えば、各種栄養物質等を供給し、微生物の持つ環境汚染物質の分解除去能力を増強させる方式（バイオスティミュレーション）と、環境汚染物質を分解除去する能力を持つ微生物を汚染環境に直接導入する方式（バイオオーギュメンテーション：例えば、特許文献1参照）とがある。TCEに汚染された地下水の環境修復を、バイオスティミュレーションとバイオオーギュメンテーションにより行い、優れた成果をあげた例もある。

**【0005】**

バイオレメディエーションを適用するにあたり、その汚染サイトがバイオスティミュレーション可能か、あるいは、系外から汚染物質分解能力を持つ微生物を導入するバイオオーギュメンテーションを適用しなければならないかの判定を迅速に行うことが望まれている（例えば、特許文献2参照）。

**【特許文献1】** 特開2003-154332号公報**【特許文献2】** 特開2000-079000号公報**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

そこで、本発明は、汚染環境中に存在する微生物の汚染物質分解能力を迅速に判定できる方法の提供を目的とする。

**【課題を解決するための手段】****【0007】**

前記目的を達成するために、本発明の環境の生物活性判定方法は、テトラクロロエチレン（PCE）およびトリクロロエチレン（TCE）の少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境の生物活性判定方法であって、環境試料から抽出した核酸を遺伝子増幅方法により増幅してターゲットとし、前記ターゲットを前記有機塩素化合物の分解関連バクテリアに特有の塩基配列からなるDNAプローブの少なくとも1つとハイブリダイズさせることで前記環境中の前記バクテリアを検出し、検出された前記バクテリアの前記有機塩素化合物およびその脱塩素化物に対する分解能力に基づき、前記環境の前記有機塩素化合物の除去能力を判定することとを特徴とする。

**【発明の効果】****【0008】**

本発明者等は、PCEやTCE等の有機塩素化合物による汚染環境のバイオレメディエーションについて、汚染環境中から嫌気性有機塩素化合物分解関連バクテリアを迅速に検出できれば、バイオスティミュレーションが可能か否かの判定が容易になることに着目し



て鋭意研究を重ねた。その結果、現在報告されている18種の嫌気性有機塩素化合物分解関連バクテリアのそれぞれに特有の塩基配列からなるDNAプローブを使用すれば、例えば、一度に18種類のバクテリアについて検出が可能となることを見出し、本発明に到達した。

#### 【0009】

本発明によれば、汚染環境中の有機塩素化合物分解関連バクテリアを、DNAプローブを用いて迅速に検出し、前記汚染環境のPCEおよびその脱塩素化物の除去能力を判定できるから、例えば、バイオレメディエーションにおけるバイオスティミュレーションが可能か否かの判定が容易となり、適切な環境修復方法の選択が可能となる。さらに、環境修復方法を迅速、適切に選択することで、環境修復を安価なものとするのが可能となる。

#### 【0010】

さらに、PCEの分解は、好気性条件では困難であると考えられており、また、通常、地表より50cm以下は嫌気性であると考えられるから、例えば、PCE汚染環境や地表50cm以下の汚染環境を、本来利用可能な嫌気性微生物ではなく好気性微生物で修復することは、余分なコストの投入となる場合もある。しかし、本発明によれば、嫌気性有機塩素化合物分解関連バクテリアを検出して、前記バクテリアの分解活性に基づき環境の生物活性を判定できるから、余分なエネルギーの使用を回避することが可能となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0011】

本発明において、検出する有機塩素化合物分解関連バクテリアは、下記AからRのバクテリアからなる群から選択される少なくとも1種を含むバクテリアであることが好ましい。

- A: デハロスピリillum マルチヴォボランス (Dehalospirillum multivorans)
- B: デスルフイトバクテリアム フラピエリ (Desulfitobacterium frappieri)
- C: アクチノマイセタレス Sm-1 (ロドコッカス sp. Sm-1) (Actinomycetales Sm-1 (Rhodococcus sp. Sm-1))
- D: ロドコッカス ロドコッカス (Rhodococcus rhodococcus)
- E: キサントバクター フラバス (Xanthobacter flavus)
- F: マイコバクテリアム L1 (Mycobacterium L1)
- G: デスルフォミクロビウム ノルベギカム (デスルフォヴィブリオ バキュラタス) (Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus))
- H: デスルフイトバクテリアム デハロゲナンス (Desulfitobacterium dehalogenans)
- I: デスルフイトバクテリアム ハフニエンス (Desulfitobacterium hafniense)
- J: クロストリジウム フォルミコアセチカム (Clostridium formicoaceticum)
- K: デスルフロノナス クロロエテニカ (Desulfuromonas chloroethenica)
- L: アセトバクテリアム ウッディ DSM 1030 (Acetobacterium woodii DSM 1030)
- M: デハロバクター レストリクタス (Dehalobacter restrictus)
- N: デスルフイトバクテリアム sp. PCE1 (Desulfitobacterium sp. strain PCE1)
- O: デスルフイトバクテリアム フラピエリ TCE1 (Desulfitobacterium frappieri TC E1)
- P: アセトバクテリアム ウッディ DSM 2396 (Acetobacterium woodii DSM 2396)
- Q: デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1)
- R: デハロコッコイデス エタノジェネス 195 (Dehalococcoides ethenogenes 195)

#### 【0012】

本発明の環境の生物活性判定方法において、少なくとも前記J、L、Pのいずれかのバクテリアが検出された場合、前記環境が、PCEをTCEに分解する能力を有すると判定できる。

#### 【0013】

本発明の環境の生物活性判定方法において、少なくとも前記A、G、Mのいずれかのバクテリアが検出された場合、前記環境が、PCEをシス型ジクロロエチレン (cisDCE

）に分解する能力を有すると判定できる。

【0014】

本発明の環境の生物活性判定方法において、少なくとも前記B、I、H、N、O、Qのいずれかのバクテリアが検出された場合、前記環境が、PCEおよびTCEをcisDCEに分解する能力を有すると判定できる。

【0015】

本発明の環境の生物活性判定方法において、少なくとも前記Kのバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCEおよびTCEをDCEに分解する能力を有すると判定できる。

【0016】

本発明の環境の生物活性判定方法において、少なくとも前記Rのバクテリアが検出された場合、前記環境が、PCE、TCE、DCEおよびビニルクロライド（VC）をエテンに分解する能力を有すると判定できる。

【0017】

本発明の環境の生物活性判定方法において、少なくとも前記C、D、Eのバクテリアが検出された場合、前記環境が、DCEおよびVCを二酸化炭素に分解する能力を有すると判定できる。

【0018】

本発明の環境の生物活性判定方法において、少なくとも前記Fのバクテリアが検出された場合、前記環境が、VCを二酸化炭素に分解する能力を有すると判定できる。

【0019】

本発明の環境の生物活性判定方法において、前記AからRのバクテリアに特有の塩基配列からなるDNAプローブとしては、下記（1）から（4）のいずれかのポリヌクレオチドからなるDNAプローブがあげられる。

（1）配列番号1から17および配列番号19から105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（2）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

（3）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

（4）前記（1）から（3）のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【0020】

具体的には、前記バクテリアAを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号1および配列番号19から25のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。ここで、配列番号1の塩基配列に由来する前記DNAプローブとは、前記（1）の配列番号が配列番号1である前記（1）から（4）のいずれかのポリヌクレオチドからなるDNAプローブを意味する。

【0021】

前記バクテリアBを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号2および配列番号26から30のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

【0022】

前記バクテリアCを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号3および配列番号31から35のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

【0023】

前記バクテリアDを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号4および配列番号36から40のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0024】**

前記バクテリアEを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号5および配列番号41から45のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0025】**

前記バクテリアFを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号6および配列番号46から48のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0026】**

前記バクテリアGを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号7および配列番号49から53のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0027】**

前記バクテリアHを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号8および配列番号54から57のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0028】**

前記バクテリアIを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号9および配列番号58から62のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0029】**

前記バクテリアJを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号10および配列番号63から68のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0030】**

前記バクテリアKを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号11および配列番号69から74のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0031】**

前記バクテリアLを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号12および配列番号75から79のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0032】**

前記バクテリアMを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号13および配列番号80から86のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0033】**

前記バクテリアNを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号14および配列番号87から91のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0034】**

前記バクテリアOを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号15および配列番号92から96のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0035】**

前記バクテリアPを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号16および配列番号97から99のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0036】**

前記バクテリアQを検出するためのDNAプローブとしては、配列番号17および配列番号100から105のいずれかの塩基配列に由来する前記DNAプローブが好ましい。

**【0037】**

本発明の生物活性判定方法を適用する環境としては、土壌、地下水、池および海水の少なくとも1つがあげられる。

**【0038】**

本発明のバイオレメディエーションの方法は、PCEおよびTCEの少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境のバイオレメディエーションの方法であって、本発明の環境の生物活性判定方法を行う工程と、前記有機塩素化合物分解関連バクテリアが検出された場合に、前記バクテリアの増殖および活性の少なくとも一方を促進して前記有機塩素化合物またはその脱塩素化物の分解を促進する工程と含むバイオレメディエーションの方法である。

**【0039】**

まず、本発明の環境の生物活性判定方法において、検出対象とする有機塩素化合物分解関連バクテリアについて説明する。現在、PCEの分解に関連する嫌気性バクテリアとしては、前記AからRの18種が知られている。本発明においては、前記AからRの少なくとも1種を検出対象とし、好ましくは、前記AからRの全てのバクテリアを検出対象とするが、本発明において検出対象とする有機塩素化合物分解関連バクテリアは、これらに限られず、今後PCEの分解に関連するとして明らかになるバクテリアを含むものである。なお、前記AからQのバクテリアは、以下に示す生物資源保存機関ATCCまたはDSMZの寄託番号が付されている。

A: DSM 12446   B: DSM 13498   C: ATCC 51239   D: ATCC 21197   E: DSM 10330  
F: DSM 6695   G: DSM 1741   H: DSM 9161   I: DSM 10644   J: ATCC 27076  
K: DSM 12431   L: DSM 1030   M: DSM 9455   N: DSM 10344   O: DSM 12704  
P: DSM 2396   Q: ATCC 49306

#### 【0040】

PCEの分解は、例えば、図5Aに示すとおり、PCE、TCE、ジクロロエチレン(DCE)、ビニルクロライド(VC)と進み、前記VCは、エテンまたは二酸化炭素に分解される。前記AからRのバクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する分解活性を、図5Bに示す。図5Bに示すとおり、前記AからRのバクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する分解活性は様々である。例えば、前記バクテリアRは、PCEを、エテンまで一つずつ脱塩素化していくが、前記バクテリアM、AおよびGは、PCEを、シス型のDCEに分解する。

#### 【0041】

次に、本発明の環境の生物活性判定方法において、検出対象とするPCE分解バクテリアの検出に用いるDNAプローブについて説明する。本発明におけるDNAプローブとしては、前記有機塩素化合物分解関連バクテリアに特有の配列であれば、特に制限されず、例えば、全ゲノム、tDNA、rDNA等の配列を使用できるが、好ましくは、rDNA中のITS配列である。原核生物のリボゾーマルRNA(rRNA)である、16SrRNA、23SrRNAおよび5SrRNAは、通常、一つの転写単位(オペロン)として転写されるため、16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子は隣り合ってゲノム上に配置されている。この16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子との間の領域が、16S-23S Internal Transcribed Spacer(ITS)と呼ばれる領域である。本発明者らは、前記AからQのバクテリアにおける前記ITSの配列(それぞれ、配列番号1から17)を初めて決定し、このITS配列であれば、前記AからQのバクテリアに特有のDNAプローブが作製できることを初めて見出したのである。

#### 【0042】

なお、前記バクテリアRのゲノム配列は、コーネル大のDr. Zinder氏により配列決定されたものである。本発明者らは、前記バクテリアRのITS配列(配列番号18)からなるDNAプローブが前記バクテリアRに特異的であり、前記17種のバクテリアのITS配列からDNAプローブと併用すれば、前記AからQの18種のバクテリアを全て検出できるDNAプローブとすることができるとも、初めて見出した。

#### 【0043】

さらに、本発明者らは、前記ITS配列(配列番号1から18)の一部も、DNAプローブとして使用できることも見出した。したがって、本発明の環境の生体活性判定方法に用いるDNAプローブとしては、下記(1)から(4)のいずれかのポリヌクレオチドからなるDNAプローブがあげられる。

(1) 配列番号1から18のいずれかの塩基配列またはその一部からなるポリヌクレオチド。

(2) 前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3) 前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(4) 前記(1)から(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

#### 【0044】

ここで、欠失、置換もしくは付加が可能な塩基数としては、例えば、40塩基に対して、欠失・付加で、1個～6個であり、1個～3個が好ましく、より好ましくは1個～2個であり、置換で、1個～4個であり、1個～2個が好ましく、より好ましくは1個である。ハイブリダイズする前記ストリンジェントな条件としては、例えば、配列番号で示された塩基配列の $T_m$ 値の $\pm 10^\circ\text{C}$ があげられる。また、前記相同性としては、例えば、90%以上であり、95%以上が好ましく、より好ましくは、97.5%以上である。

#### 【0045】

本発明におけるDNAプローブとしては、前記ITS配列全体よりもその一部の塩基配列からなるものが好ましい。DNAプローブは、通常、その長さが短くなるほど配列特異性が増し、信頼度が向上するからである。一方、配列自体が前記バクテリアそれぞれに対して特有である必要がある。したがって、DNAプローブの長さとしては、特に制限されないが、例えば、10塩基から前記ITS配列全体であり、40～80塩基が好ましい。

#### 【0046】

前記配列番号1から18のITS領域の一部である塩基配列の具体例が、長さ40塩基の配列番号19から115の塩基配列である。配列番号19から25が配列番号1の一部に該当し、配列番号26から30が配列番号2の一部に該当し、配列番号31から35が配列番号3の一部に該当し、配列番号36から40が配列番号4の一部に該当し、配列番号41から45が配列番号5の一部に該当し、配列番号46から48が配列番号6の一部に該当し、配列番号49から53が配列番号7の一部に該当し、配列番号54から57が配列番号8の一部に該当し、配列番号58から62が配列番号9の一部に該当し、配列番号63から68が配列番号10の一部に該当し、配列番号69から74が配列番号11の一部に該当し、配列番号75から79が配列番号12の一部に該当し、配列番号80から86が配列番号13の一部に該当し、配列番号87から91の配列番号14の一部に該当し、配列番号92から96が配列番号15の一部に該当し、配列番号97から99が配列番号16の一部に該当し、配列番号100から105が配列番号17の一部に該当し、配列番号106から115が配列番号18の一部に該当する。

#### 【0047】

次に、前記DNAプローブを用いた前記有機塩素化合物分解関連バクテリアの検出方法としては、特に制限されず、例えば、対象環境の試料から抽出した核酸からターゲットを調製し、前記ターゲットと前記DNAプローブとのハイブリダイゼーションを利用する方法で検出できる。前記ターゲットは、試料中のバクテリアの配列であって、前記DNAプローブの配列の相補配列であり、検出方法に応じた標識をされた前記ターゲットと前記DNAプローブとがハイブリダイズすることで検出可能となる。前記ハイブリダイゼーションの検出方法は、例えば、サザンブロット、DNAアレイ、DNAマイクロアレイ、DNAチップ等、従来公知の遺伝子検出技術を利用できる。これらのなかでも、前記AからRの全てバクテリアに対応するDNAプローブを固定したものであれば、一度に環境試料中のバクテリアの検出ができることから好ましい。

#### 【0048】

本発明の生物活性判定方法の対象環境としては、特に制限されず、例えば、汚染された土壌、地下水、池、海水等があげられる。前記対象環境の試料から核酸を抽出する方法は、特に制限されず、従来公知の方法でよく、例えば、市販の核酸抽出キットを用いることができる。前記ターゲットは、前記核酸のDNAプローブに対応する領域を増幅することで調製できる。前記核酸は、例えば、DNAでもよく、RNAでもよい。遺伝子増幅方法も、特に制限されず、従来公知の増幅方法を適用できる。また、前記ハイブリダイゼーション

ンの検出方法に応じて、遺伝子増幅と同時に、ターゲットに標識することも好ましい。前記標識としては、特に制限されず、例えば、蛍光標識や R I 標識を利用できる。前記 I T S 領域を利用した DNA プローブに対応するターゲットを P C R 法で調製する場合、そのプライマーとして、例えば、センスプライマーとして配列番号 116 で表される塩基配列からなるプライマーを使用でき、アンチセンスプライマーとしては、前記バクテリア R 以外には、配列番号 117 で表される塩基配列からなるプライマーを使用でき、前記バクテリア R には、配列番号 118 で表される塩基配列からなるプライマーを使用できる。

#### 【0049】

以上のようにして、環境中の有機塩素化合物分解関連バクテリアを検出できるが、前記環境の P C E および T C E の除去能力の判定は、例えば、検出されたバクテリアと図 5 B とを比較することで行うことができる。

#### 【0050】

次に、本発明のバイオレメディエーションの方法は、P C E および T C E の少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境のバイオレメディエーションの方法であって、本発明の環境の生物活性判定方法を行う工程と、前記方法により前記有機塩素化合物分解関連バクテリアが検出された場合に、前記バクテリアの増殖および活性の少なくとも一方を促進して前記有機塩素化合物またはその脱塩素化物の分解を促進する工程と含むバイオレメディエーションの方法である。バイオレメディエーションにあたり、予め本発明の生物活性判定方法により環境の P C E 等の有機塩素化合物の分解除去能力を把握することで、よりの確かつ迅速なバイオレメディエーションの方法の選択が可能となる。例えば、バクテリア R が検出されれば、前記バクテリア R で P C E をエテンにできるから、前記バクテリア R の増殖や活性を高める栄養素を環境に導入するバイオスティミュレーションを選択できる。また、例えば、バクテリア K と C とが検出された場合も、前記 2 種のバクテリアで P C E を二酸化炭素に分解できるから、前記 2 種のバクテリアの増殖や活性を高める栄養素を環境に導入するバイオスティミュレーションが選択できる。また、前記有機化合物分解関連バクテリアが検出されない場合は、バイオスティミュレーションを行わないという選択ができる。

#### 【0051】

以下に、本発明の実施例について説明する。

#### 【実施例 1】

#### 【0052】

松下空調環境エンジニアリング株式会社の提供による土壌試料の 250 mg から、Fast Prep bead-beater and soil DNA extraction kit (Q Biogene 社製) を用い、取扱い説明書に従って、DNA を抽出した。前記 DNA の約 1  $\mu$  l を、非標識センスプライマー 27 F (配列番号 116) と Cy 3 標識アンチセンスプライマー 132 R (配列番号 117) または 341 R (配列番号 118) とを含む 50  $\mu$  l の standard Amplitaq Gold PCR 混合液 (アプライドバイオシステムズ社製) に添加した。P C R を標準的なプロトコールにより行った後、P C R 増幅産物を Autoseq G-50 (ファルマシア社製) を用いて脱塩し、SpeedVac (Savant 社製) を用いて吸引乾燥した。乾燥した前記 P C R 増幅産物を、最終濃度が 5  $\times$  S S C、0.2 % S D S、50 % ホルムアミドであるバッファーに溶解させ、その溶解液を、94  $^{\circ}$ C で 3 分間ボイルして少なくとも 2 分間氷冷した後、DNA マイクロアレイ上にアプライした。その後、カバーガラスを前記マイクロアレイ上にかぶせ、そのように準備したものを 42  $^{\circ}$ C で設定されたハイブリダイゼーションチャンバー内に少なくとも 4 時間配置した。その後、DNA マイクロアレイを、0.2  $\times$  S S C、0.2 % S D S で 5 分間、0.2  $\times$  S S C で 5 分間、そして、0.05  $\times$  S S C で数秒間洗浄し、1,800 r p m でスピンドライした。その後、DNA マイクロアレイを Scanarray version 5 (パーキンエルマージャパン社製) でスキャンした。

#### 【0053】

なお、前記 DNA マイクロアレイは、Affymetrix 417 Arrayer を用いて DNA プローブを Takara Hubble Slide にカスタムプリントして作製した。使用した DNA マイクロアレ

イ上のプローブは、バクテリアAのプローブA1からA7が、それぞれ、配列番号19から25の塩基配列であり、バクテリアBのプローブB1からB5が、それぞれ、配列番号26から30の塩基配列であり、バクテリアCのプローブC1からC5が、それぞれ、配列番号31から35の塩基配列であり、バクテリアDのプローブD1からD5が、それぞれ、配列番号36から40の塩基配列であり、バクテリアEのプローブE1からE5が、それぞれ、配列番号41から45の塩基配列であり、バクテリアFのプローブF1からF3が、それぞれ、配列番号46から48の塩基配列であり、バクテリアGのプローブG1からG5が、それぞれ、配列番号49から53の塩基配列であり、バクテリアHのプローブH1からH4が、それぞれ、配列番号54から57の塩基配列であり、バクテリアIのプローブI1からI5が、それぞれ、配列番号58から62の塩基配列であり、バクテリアJのプローブJ1からJ6が、それぞれ、配列番号63から68の塩基配列であり、バクテリアKのプローブK1からK6が、それぞれ、配列番号69から74の塩基配列であり、バクテリアLのプローブL1からL5が、それぞれ、配列番号75から79の塩基配列であり、バクテリアMのプローブM1からM7が、それぞれ、配列番号80から86の塩基配列であり、バクテリアNのプローブN1からN5が、それぞれ、配列番号87から91の塩基配列であり、バクテリアOのプローブO1からO5が、それぞれ、配列番号92から96の塩基配列であり、バクテリアPのプローブP1からP3が、それぞれ、配列番号97から99の塩基配列であり、バクテリアQのプローブQ1からQ6が、それぞれ、配列番号100から105の塩基配列であり、バクテリアRのプローブR1からR10が、それぞれ、配列番号106から115の塩基配列である。

#### 【0054】

前記DNAマイクロアレイをスキャンした結果の一部を図1に示す。図1Aは、スキャンイメージを示し、図1Bは、定量化した結果のグラフを示す。図1に示すとおり、バクテリアM (*Dehalobacter restrictus* DSM 945) のプローブに対する有意なハイブリダイズが検出された。従って、前記試料の土壌には、PCEをcisDCEに分解する能力があると判定できた(図5B参照)。

#### 【0055】

なお、前記97種類のDNAプローブが、それぞれのバクテリアに特異的であり、クロスハイブリをしないことを、ターゲットを前記AからRのバクテリアからそれぞれ調製し、そのターゲットを前記DNAマイクロアレイとハイブリダイズすることで確認した。

#### 【0056】

その結果をまとめたものを図2に示す。図2は、縦軸に示された18のバクテリアのITS配列のターゲットと、横軸に示す97のDNAプローブとハイブリダイズしたかどうかを示すグラフであり、黒塗りの部分が、500蛍光ユニット以上のシグナルを示してDNAプローブとターゲットとがハイブリダイズしたことを示す。なお、横軸の系統樹は、ITS配列のアライメントから作製したものである。図2に示すとおり、前記AからRのバクテリアそれぞれから調製したターゲットは、クロスハイブリダイズすることなく、前記AからRのバクテリアのDNAプローブのみと有意にハイブリダイズすることが示された。

#### 【実施例2】

##### 【0057】

前記土壌試料の代わりに、松下空調環境エンジニアリング株式会社の提供による300mlの地下水試料を使用し、7,000rpmで遠心分離したデブリからDNAを抽出した場合は、実施例1と同様にして、前記地下水試料中のバクテリアを前記DNAマイクロアレイを用いて検出した。

##### 【0058】

その結果の一部を図3に示す。図3Aは、スキャンイメージを示し、図3Bは、定量化した結果のグラフを示す。図3に示すとおり、バクテリアJ (*Clostridium formicoaceticum* ATCC 27076) のプローブに対する有意なハイブリダイズが検出された。従って、前記試料の土壌には、PCEをTCEに分解する能力があると判定できた(図5B参照)。

**【実施例 3】****【0059】**

前記土壌試料の代わりに、T.H. Lee博士（韓国）の提供による嫌氣的集積培養試料を用いた他は、実施例 1 と同様にして、前記試料中の前記バクテリアを検出した。

**【0060】**

その結果を図 4 に示す。図 4 に示すとおり、バクテリア A、J、M、N および O の一部のプローブに強いシグナルが検出され、バクテリア B および I のプローブからも弱いシグナルが検出された。したがって、前記試料には、PCE を cisDCE に変換する能力があると判定できた（図 5 B 参照）。この判定結果は、T.H. Lee 博士による前記集積培養の PCE/cisDCE の分析データと一致する内容であった。

**【産業上の利用可能性】****【0061】**

以上、説明したとおり、本発明の環境の生物活性判定方法は、汚染環境の修復方法、とりわけ、バイオレメディエーションの分野で有用である。

**【図面の簡単な説明】****【0062】**

【図 1】 図 1 は、本発明の一例におけるバクテリアの検出結果を示す図である。

【図 2】 図 2 は、本発明の一例における DNA マイクロアレイによる検出結果を示す図である。

【図 3】 図 3 は、本発明のその他の例におけるバクテリアの検出結果を示す図である。

【図 4】 図 4 は、本発明のさらにその他の例におけるバクテリアの検出結果を示す図である。

【図 5】 図 5 は、本発明に関わる嫌気性有機塩素化合物分解関連バクテリアの分解活性を説明する図である。

**【配列表フリーテキスト】****【0063】**

配列番号 116	PCR 用センスプライマー 27F
配列番号 117	PCR 用アンチセンスプライマー 132R
配列番号 118	PCR 用アンチセンスプライマー 341R



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Gifu University  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology  
Matsushita Environmental & Air-conditioning Engineering Co.,Ltd.

<120> Bioactivity Assay for Bioremediation

<130> 8009150036

<160> 118

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 742

<212> DNA

<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 1

```

aagtcgtaac aaggtaaccg taggagaacc tgcggttgga tcacctcctt tctagagtat      60
aggggcacta tctcacaatg gtgctccggc gagcatagct agggaagctt atttagtttt      120
gagagattga atgaaaaagg ggcttatagc tcagggtggt agagcgtacc cctgataagg      180
gtaaggtcag aggttcgagt cctcttaagc ccaccatggg gaattagctc agctgggaga      240
gcgcctgctt tgcacgcagg aggtcagcgg ttcgatcccg ctattctcca ccatttttta      300
gagaaatggt gaaagattgc caagagacat tgtagtgag aatgaagaca caatgtctaa      360
tataagaaca atttaggttg tttttatatt agacttttta gtctaagttt atgttctaca      420
atttagaata cgacgctttg tgttgtgctg taggtttggt tctttaagat agctttgcta      480
tctggtgaaa gaacataaag atgttattta atttattatt gtcaaagtca acaaaacgca      540
aaaaaaacaa tttacaactt gtagatggt ttacatttaa taaggagtg aaatgtgcat      600
tagaatacaa ataggtaagc tattaagagc gaatggtgga tgcctaggct gtaagaggcg      660
atgaaggacg tactagactg cgataagtta cggggagctg tcaagaagct ttgatccgta      720
aatttccgaa tggggcaacc ca                                              742

```

<210> 2

<211> 527

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Desulfitobacterium frappieri

&lt;400&gt; 2

aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
catgttcact ctggaagtga gcatatccta aggtcgaatgc tttgaaggac gtcacggaag 120  
agatgaagtg aaacgggttca aagctggaga agtctgaaga gacttcgaaa tgccgaagag 180  
gcaaagcagg ggaaatctgc ataagatgac cctgaaatcg agtcaaacct gttcaagcgc 240  
aagcttactt gttgtttagt tttgaggac cagcaatgga aactcattat ttttttgacc 300  
aaaagtcaag aaaaactggt ctttgaaaac tgcacagaga agaaaaaact gtaatttagg 360  
ataacatctg aaaaacctga atgtggcgga gacgtttggt caagctacta agggcgtagc 420  
gtggatgcct aggcgctaag agtcgaagaa ggacgcggcg agcggcgaaa cgccacgggg 480  
agcagtaagc atgctttgat ccgtggatat ccgaatgggg caaccca 527

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 478

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Actinomycetales Sm-1

&lt;400&gt; 3

aagtcgtaac aaggtagccg taccggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagc 60  
aactcccgtc ggtgggtcac acaggtgact ccgccacggg cagagccatt tcggattcac 120  
acgtaatccg gtgggtgctca tgggtggaac gctgacagct acttctcgtc cgggtcccgt 180  
ttctgtgcgg gatccgagga gttatatcgg tgcactgttg ggtcctgaga gaacacgcga 240  
gtgttttgtc agcgacgatg atccgcgaaa caagaggaca tggttttctt gcggtagggg 300  
ttgtttgttg ttgtttgaga actgcacagt ggacgcgagc atctttgttg taagtgttta 360  
tgagcgtacg gtggatgcct tggcaccagg agccgatgaa ggacgtggga ggctgcgata 420  
tgcctcgggg agctgtcaac cgagctgtga tccgaggatt tccgaatggg gcaaccca 478

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 478

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rhodococcus rhodococcus

<400> 4  
aagtcgtaac aaggtagccg taccggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagc 60  
aactccttgc tcggaccagc acacaggtgc cgggggagcg aggcagagcc atttcggatt 120  
cacacgtaat ccggtggtgc tcatgggtgg aacgctgaca gtcattaccg cgcgggaagg 180  
acccgagtgt ctttctgcgg tggttatatc ggtgcactgt tgggtcctga gagaacacgc 240  
gagtgttttg tcagcgacga tgatcgggaa cgaaggggtt gtttcttctt ccggtaccgg 300  
ttgttgtgtg ttgtttgaga actgcacagt ggacgcgagc atctttgttg taagtgttta 360  
tgagcgtacg gtggatgcct tggcaccagg agccgatgaa ggacgtggga ggctgcgata 420  
tgcctcgggg agctgtcaac cgagctgtga tccgaggatt tccgaatggg gaaacca 478

<210> 5  
<211> 952  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 5  
aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggctgga tcacctcctt tctaaggacg 60  
atccctcagt attgagactt cggctctgat ctatcggatc tcttcagaaa catcagccgg 120  
acataggtgg aaacatcatg atctggcatt ggccggacac cgccgtcttc gtttctcttt 180  
cttcgcggac aagcttgacg cccaggttgc ggtcctttgg actgcgttcc ggtttcgggc 240  
ctgtagctca ggtggttaga gcgcaccctt gataaggggtg aggtcggacg ttcgagtcgt 300  
cccaggccca ccaccatcag acagttcttg cctgcgcctc atgtccgaag cttgcggaac 360  
tctgcctgtt ggcatcctgt gatggggcca tagctcagtt gggagagcgc gtgctttgca 420  
agcatgaggt cgtcggttcg atccgtctg gctccaccat tcttcttttc ttgaggaaga 480  
tgatggcagg gtggtttgcg ctcggctcct ttgagtgaag gctcttgggg tcttgagcgt 540  
cttgtccgcg aatatctgtt tcgcatgttc catcatgccg gtctccggcg gaacatgcac 600  
ggctgtatga catcgtgaat agggcattga tcgactgtac cgtggcaaca cggtcgggtc 660  
gtggggaagg tggcgacacc tttcgatgcg atcattgggt gctgaccgca ccattgtcga 720  
caatgcgaag ctggtctttt caaagaagac gtcgaagccg tccggccggg agcaatcctg 780

gtgcgggcct ctgccgaggg gtgggcatcg acgatgagaa cgatcaagtg tcttaagggc 840  
attcgggtgga tgccttggcg ctaagaggcg aagaaggacg tgatacgctg cgataagctt 900  
cggggagccg cgaatgggct ttgatccgga gatttccgaa tggggcaacc ca 952

<210> 6  
<211> 579  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 6  
aagtcgtaac aaggtagccg taccgaaggt gcggctggat cacctccttt ctaaggagca 60  
ccacgagacc tggccggccc gtaaatcgcg ggatcagccg attgtcaggc gattcgttgg 120  
atggcccttt cacctgtagt ggggtgggggt ctggtgcacg acaagcaaac gaccaggatg 180  
gggaccttcc ttgtgggggt tgtctggtgc tgccaaacac actgttgggc tttgagacaa 240  
caggcccgtg cccgggtttc cgggtggctc cgcggtggtg gggtcggcgt gttgttgctt 300  
cactttggtg gtggggtgtg gtgtttgatt tgtggatagt ggttgcgagc atctagcacg 360  
caaagtggc tctcgaggct ttcgggtctg gggggtgtgt ttgtgtgctt ttgatgtgca 420  
gtttcttttt tcgaattggg tttttgtgtt gtaagtgttt aagggcgcat ggtggatgcc 480  
ttggcactgg gagccgatga aggacgtggg aggctgcgtt atgcctcggg gagctgtcaa 540  
ccgagcgtgg atccgaggat gtccgaatgg ggcaaccca 579

<210> 7  
<211> 523  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 7  
aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggctgga tcacctcctt atcaagaatt 60  
ctccaactcg ctatttactt gcaagggttc ttaccttgtc ggttttagaaa tgggcttgta 120  
gtcaggtgg ttagagcgca cgctgataa gcgtgaggtc ggaagttcaa gtcttcccag 180  
gcccaccatt tcttagtggg ggtgtagctc agctgggaga gcgcctgcct tgcacgcagg 240  
aggatcatcag ttcgatcctg ttcacctcca ccattttcca actcgacaag aatttatgtt 300

gctagtcttt atcgtcagag tgtcttttga cactatggcg cccaagcata gcagcttgtg 360  
atcattgaca gacgaatagg tgaagagaag agagttaaga tgtaagggc atacggtgga 420  
tgccttggcg tcaggaggcg atgaaggacg tggaaggctg cgataagcct cggggagccg 480  
tcaagcaggc ttgatccgg ggatttccga atggggcaac cca 523

<210> 8  
<211> 662  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 8  
aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
catggtttct cgctagagaa atcatatcct aaggtcgatg ctttgaagaa cgtcacggaa 120  
gcaatgaagt gaaacgattc aaagtcggag aagtcctaag agacttctta taggaaactt 180  
ggcttgtgtg aagcatgagc agaagccata gttgacttat ccacggagtg gaaaaatgcc 240  
gaagaggcaa aacggagcaa tccgtaaagt atgggaaatg aagctgttga agttaaaagc 300  
taacttgttg tttagttttg agggaccata aagtcttcta tatgggggta tagctcagct 360  
gggagagcac ctgccttgca agcaggggggt cagcggttcg atcccgtta cctccaccat 420  
aatatatctg gtttctctaa tgtttattat gttctttgaa aactgcacag agaagaagaa 480  
aactgtaatt aggataacat ctaaaaccta gaagtggcgg caaaaaacgt ttggtcaagc 540  
tactaagggc gtacggtgga tgcctaggcg ctaagagtcg aagaaggacg cggcgagcgg 600  
cgaaacgcca cggggagcag taagcatgcc ttgatccgtg gatatccgaa tggggcaacc 660  
ca 662

<210> 9  
<211> 775  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 9  
aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagc 60  
catgttcact ctggaagtga gcataatccta aggtcgatgc tttgaaggac gtcacggaag 120

agatgaagtg aaacggttca aagctggaga agtctataga gacttcgaag tgccgaagag 180  
 gcaaagcagg ggaaatctgc ataagatgac cctgaagtcg agtcaaacct gttcaagcgc 240  
 aagcttacttt gttgttttagt tttagagagac cataaagtct tctatgggct tatagctcag 300  
 ctggtttagag cgcacgcctg ataagcgtga ggtcgggtggt tcgagtccac ctaggcccac 360  
 cattattcaa agaggataga gacccgaacc tccaaacaat acttcacgcc agaacatacc 420  
 taacaggggt gagtattgag aggggagcgg ctcccctctc aacgacatgg gggtatagct 480  
 cagctggggg agcacctgcc ttgcaagcag ggggtcagcg gttcgatccc gcttacctcc 540  
 accatcatat actggtttct ctaatgttct ttgaaaactg cacagagaag aaaaaactgt 600  
 aatttaggat aacatctgaa aaacctgaat gtggcggaga cggttgggtca agctactaag 660  
 ggcgtacggt ggatgcctag gcgctaagag tcgaagaagg acgcggcgag cggcgaaacg 720  
 ccacgggggag cagtaagcat gccttgatcc gtggatatcc gaatggggca accca 775

<210> 10  
 <211> 422  
 <212> DNA  
 <213> Clostridium formicoaceticum

<400> 10  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
 aaggctttta ctatactgtt taattttgag ggacttttgt ttctcaataa gcagacaacc 120  
 aaaatcctag attttgtgtt agtcgcttag ttaaaaattc tgtaattcac gacaatagtt 180  
 ttaaaccaac aaaaaatgaa tggaagaatt tttaacatct atagtctttt agattgttct 240  
 ttgaaaacta aacaatgata tgagaaaaga aaagctgaag taattcacta aaggtcaagt 300  
 tattaagggc aaagggtgga tgccttgga ctaggagccg aagaaggacg tggtaagctg 360  
 cgaaaagcca cggggagctg caagcaagta ttgatccgtg gatgtccgaa tggggaaacc 420  
 ca 422

<210> 11  
 <211> 699  
 <212> DNA

## &lt;213&gt; Desulfuromonas chloroethenica

&lt;400&gt; 11

aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggcctgg atcacctcct ttctaaggag 60  
cctccttact cgtaagagta aaggcatcct ggtcaatccc tcggcatggg ccgagcggat 120  
gccccgaaag catcattgtc tgctatttag ttttgagaga ccagaacctc gcaagaggtt 180  
ttttgttctt tgagacaaga cgaacgaagg tggaagtggg ctagtagctc agctggctag 240  
agcacacgac tgataatcgt gaggtcggag gttcgagtc tccctggccc accagattat 300  
ttgggggtgt agctcagttg ggagagcgcc tgccttgac gcaggaggtc atcggttcga 360  
tcccgttcac ctccaccaga tgttctgtca ggagtaagga gagaagagtg aggagtacac 420  
ctcacctaa cgccttacgc ctccaccgatt ttcttgttct ttggcaattg cataagactg 480  
atacgatgca cgaagtaaag cgttgcgtac gcaagtacgt gacacgcgaa ggtagcaaca 540  
cgatcgctta agtagaagac tttttatgg tcaagctatt aagggcgtac ggtggatgcc 600  
ttggcatcgg gaggcgatga aggacgtggg aagctgcgaa aagcttcggg aagccgctaa 660  
acaggctttg acccgagat gtccgaatgg ggaaacca 699

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 391

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acetobacterium woodii

&lt;400&gt; 12

aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctagggaat 60  
acaggaagtc atggtactat tttcttttgt atgaccatct ggttatgcaa aaacagttaa 120  
agaaggcatc ttaggatgca ttttttaacg ggacaaatac cggagtagtg gtagcaggtc 180  
ccaatcgatc attgaaaaca gcatagtgt taaataaaat tataaaatac aatttcttaa 240  
cacgaaaacg taaattatta ggatcaagaa gaaaagagca cagggtgaat gccttggcaa 300  
tcagagccga cgaaggacgc gacaagctgc gaaaagctac gtgtaggtgc acataaccgt 360  
taaagcgtag atatccgaat ggggcaaccc a 391

&lt;210&gt; 13

<211> 608  
 <212> DNA  
 <213> Dehalobacter restrictus

<400> 13  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
 accgattgaa gctagacttc aatctactcc aaggtcggta cttagagtaa agcagtgcaa 120  
 actggactga ctctcaagta aggtgagttt agcaatttat ttcttggtgt ttagttttga 180  
 gtgacctgag cacagtaatg tgtaaaagaa aactcaaat aatgtccata catatcagag 240  
 attctggtaa gtatggaaaa acatccttgt tctttgaaaa ctgcacaacg agaaaagcag 300  
 aatgcgaaat gcgaaagtaa agacaacgaa atggcggttca aattctaaag cgcaaaaact 360  
 taacgttttc gcgcgtggca aatttgaact taggagcatc tatgctccgt caggtaagaa 420  
 ttactaagcg cataggagac attcaaatca tctataacaa gtcgaggaag aaccagaagg 480  
 tcaagatata aagggcatac ggtggatgcc ttggcgccaa gagccgaaga aggacgcggt 540  
 taacagcgaa atgccacggg gagtcgtaag caggcataga tccgtggatg tccgaatggg 600  
 gaaaccca 608

<210> 14  
 <211> 689  
 <212> DNA  
 <213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 14  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
 catggtttct cgctagagaa atcatatcct aaggtcgatg ctttgaagga cgcataggaa 120  
 gcaatgaagt gaaacgattc aaagtggag aagtcttaag agacttctga aagccgaaga 180  
 ggcaaacgg agcaatccgt aaagtatgag aaatgaagct gttgaagtta aaagctaact 240  
 tgttgtttag ttttgaggga ccataaagtc ttctatgggc ttatagctca gctggttaga 300  
 gcgcacgcct gataagcgtg aggtcgggtg ttcgagtcca cctaggccca ccataaaga 360  
 ttgatattgt gggggtatag ctcagctggg agagcacctg ccttgcaagc aggggggtcag 420  
 cggttcgacc ccgcttacct ccaccataat atatctggtt tctctaagt ttattatggt 480



ctttgaaaac tgcacagaga agaagaaaac tgtaattagg ataacatcta aaacctagaa 540  
gtggcggaac aaaacgtttg gtcaagctac taaggcgta cggtggatgc ctaggcgcta 600  
agagtcgaag aaggacgcgg cgagcggcga aacgccacgg ggagcagtaa gcatgccttg 660  
atccgtggat atccgaatgg ggcaacca 689

<210> 15  
<211> 468  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 15  
aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagt 60  
tcataaggac tcacactggt ttgtttataa atttgattcg ctgaatttcc agaatcaatc 120  
acattgaaat cctttggatt tcaattgtta attgtgact gtgaaatgcg aattgataac 180  
gtgggggtgt agtcagttg ggagagcacc tgccttgcaa gcagggggtc aggagttcga 240  
ctctcctcat ctccaccaa gacattcata gtttaaatta attatgaatt gtttaaactg 300  
aacattgaaa actacaaata tacaataaac atgaaatagg tcaagttatt aaggcgtag 360  
ggcgaatgcc ttggcaccaa gagccgatga aggacgggat aagcaccgat atgcttcggg 420  
gagtcgcaa tagacattga tccggagatt tccgaatggg gcaacca 468

<210> 16  
<211> 511  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 16  
aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaaa 60  
acagggagtc atggtactat tttcttttgt atgaccttta ggttatacaa aaggatcgta 120  
gtttctggca attttcttta tttttataaa gatgaaaatt gacataaact gcgttagttt 180  
ttacaccgct catgcgctaa cgcttaatga gctgccaaat tgaaaatttg ggtaaaaacg 240  
tcaaagtggc cattgaaaac agcatagtgt attaaaaaaa catacaattt cagatgttaa 300  
caacataaga aaaacgtaag ttaaaggatc gtagttttag gactacaggc gactgacgaa 360

gttctactgt cagttgttaa ggatcaagaa atgaaggga cagggcggat gccttggcac 420  
 tcagagccga tgaaggacgc gacaagctgc gaaaagctgc gtgaagggtgc acataaccgt 480  
 tgaagcgcag atatccgaat ggggcaaccc a 511

<210> 17  
 <211> 471  
 <212> DNA  
 <213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 17  
 aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggctgga tcacctcctt tctaaggtgt 60  
 aaccttagta tccgaacgca cacatctgct attcagttct gagagggtga cgataacggc 120  
 ttcgggccta tagctcagtt cggtttagagc gcacgcctga taagcgtgag gtcgttgggt 180  
 caattccaac tagggcccacc acgcctctat cgggggtgta gtcagctgg gagagcacct 240  
 gctttgcaag caggggggtca tcggttcgaa tccgttcacc tccaccagtt ctttgacaat 300  
 cgaatagggtt ttagatcgag gatactcata tathtagga atcaagctac taagggccta 360  
 cgggtggatgc cttggcatcg gaagacgatg aaggacgtgg ttagctgcga taagcctcgg 420  
 ggagttgcta aacacactgt gatccgggga tttccgaatg gggcaaccca a 471

<210> 18  
 <211> 847  
 <212> DNA  
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 18  
 ggactggtaa ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgta gcggaagctg cggctggatc 60  
 acctccttcc taaggataat tggcctcgtg cctattaacc taggtcgata tccgacttaa 120  
 aacggatact tctcttttct ttccgctatc caggggttaa ggtgttagtg ttataagggg 180  
 ataaaaatta ctttctcctg attgctaacc tgtatctatc ccgctttgaa actcatgtag 240  
 gttttgtag gcattttggg ctgaaggact tgcgctaagc gtcctgtttg ctatattata 300  
 ttgacgtttt tcgggtagta tttcgaagat acccaatctg tctgttggtta tcaatcgggc 360  
 cattagctca gctgggttaga gcgcagtcct gataagactg aggtccttgg ttcgagacca 420

agatggccca ccataaagct aaaacttagc ataatcaaac gaataaaaat acctgctgat 480  
taaccggttt ttcgcgagag aaccggtttt tttataaaga agcaggaaga taatgtctat 540  
tatttcattt taggtgaata acctgcgctg caaattggta tagtttagta ttcaccgggt 600  
tattgggcgg gcaaaaaaat ctttgtgaaa tgaaaatatt tactttaaaa agactgattg 660  
ccggaggtaa tataacagta tgataagtaa tgaaggttca gaaaaagtat tatctccgga 720  
agaacaggct aaattacttg gcctgcttaa agggcgTTTT gagcaaaata tacaccgcca 780  
cgagggcatt gtttgggcta aggtgcaaga aaagcttaag gcagataccc ttaaattgtg 840  
gtcattg 847

<210> 19  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 19  
aggctgtaag aggcgatgaa ggacgtacta gactgcgata 40

<210> 20  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 20  
gctgtaagag gcgatgaagg acgtactaga ctgcgataag 40

<210> 21  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 21  
cggttggatc acctcctttc tagagtatag gggcactatc 40

<210> 22  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 22

gcggttgat cacctccttt ctagagtata ggggcactat

40

<210> 23  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 23  
tgcggttgga tcacctcctt tctagagtat aggggcacta

40

<210> 24  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 24  
ggtcagcggg tccatcccg cttattctccac catttttttag

40

<210> 25  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 25  
gaggtcagcg gttcgatccc gctattctcc accatttttt

40

<210> 26  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 26  
ctggagaagt ctgaagagac ttcgaaatgc cgaagaggca

40

<210> 27  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 27  
agctggagaa gtctgaagag acttcgaaat gccgaagagg

40

<210> 28  
<211> 40

<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 28  
agtctgaaga gacttcgaaa tgccgaagag gcaaagcagg 40

<210> 29  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 29  
tgaagagact tcgaaatgcc gaagaggcaa agcaggggaa 40

<210> 30  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 30  
gaagagactt cgaaatgccg aagaggcaaa gcaggggaaa 40

<210> 31  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 31  
gcgacgatga tccgcgaaac aagaggacat gggttttcttg 40

<210> 32  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 32  
tgatccgcga aacaagagga catgggttttc ttgcggtagg 40

<210> 33  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 33  
caagaggaca tgggttttctt gcggtagggg ttgttgtgtg 40

<210> 34  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 34  
tcagcgacga tgatccgcga aacaagagga catggttttc 40

<210> 35  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 35  
gaggacatgg ttttcttgcg gtaggggttg ttgtgtgttg 40

<210> 36  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 36  
gttttgtcag cgacgatgat cgggaacgaa ggggttgttt 40

<210> 37  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 37  
acgatgatcg ggaacgaagg ggttgtttct tcttccggtta 40

<210> 38  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 38  
tttgtcagcg acgatgatcg ggaacgaagg ggttgtttct 40

<210> 39  
<211> 40  
<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 39  
tcagcgacga tgatcgggaa cgaaggggtt gtttcttctt 40

<210> 40  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 40  
ggggttgttt cttcttccgg taccggttgt tgtgtgttgt 40

<210> 41  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 41  
catcgtgaat agggcattga tcgactgtac cgtggcaaca 40

<210> 42  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 42  
acatcgtgaa tagggcattg atcgactgta ccgtggcaac 40

<210> 43  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 43  
ggtcttgagc gtcttgccg cgaatatctg tttcgcattg 40

<210> 44  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 44  
atgacatcgt gaatagggca ttgatcgact gtaccgtggc 40

<210> 45  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 45  
ctcttgggggt cttgagcgtc ttgtccgcga atatctgttt 40

<210> 46  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 46  
ggctctggggg gtgtgtttgt gtgcttttga tgtgcagttt 40

<210> 47  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 47  
gtctggggggg tgtgtttgtg tgctttttgat gtgcagtttc 40

<210> 48  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 48  
attgtcaggc gattcgttgg atggcccttt cacctgtagt 40

<210> 49  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 49  
gcgccaagc atagcagctt gtgatcattg acagacgaat 40

<210> 50  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum



<400> 50  
cagttcgatc ctgttcacct ccaccatttt ccaactcgac 40

<210> 51  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 51  
ctatggcgcc caagcatagc agcttgtgat cattgacaga 40

<210> 52  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 52  
tatggcgccc aagcatagca gcttgtgatc attgacagac 40

<210> 53  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 53  
actatggcgc ccaagcatag cagcttgtga tcattgacag 40

<210> 54  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 54  
acggagtgga aaaatgccga agaggcaaaa cggagcaatc 40

<210> 55  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 55  
cacggagtgg aaaaatgccg aagaggcaaa acggagcaat 40

<210> 56  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 56  
tatccacgga gtggaaaaat gccgaagagg caaacggag 40

<210> 57  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 57  
agcatgagca gaagccatag ttgacttata cacggagtgg 40

<210> 58  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 58  
ctggagaagt ctatagagac ttcgaagtgc cgaagaggca 40

<210> 59  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 59  
agctggagaa gtctatagag acttcgaagt gccgaagagg 40

<210> 60  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 60  
agtctataga gacttcgaag tgccgaagag gcaaagcagg 40

<210> 61  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 61  
tatagagact tcgaagtgcc gaagaggcaa agcaggggaa

40

<210> 62  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 62  
atagagactt cgaagtgccg aagaggcaaa gcaggggaaa

40

<210> 63  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 63  
ggtcaagtta ttaagggcaa aggttgatg ccttggcact

40

<210> 64  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 64  
gtgcggctgg atcacctcct ttctaaggag aaaggctttt

40

<210> 65  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 65  
gtgccaaggc atccaccctt tgcccttaat aacttgacct

40

<210> 66  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 66  
ctcctagtgc caaggcatcc accctttgcc cttataact

40

<210> 67

<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 67  
gcggctggat cacctccttt ctaaggagaa aggcttttac 40

<210> 68  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 68  
cctagtgccca aggcacccac cctttgccct taataacttg 40

<210> 69  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 69  
ctgtcaggag taaggagaga agagtgagga gtacacctca 40

<210> 70  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 70  
gtgacacgcg aaggtagcaa cacgatcgct taagtagaag 40

<210> 71  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 71  
gagtaaggag agaagagtga ggagtacacc tcaccctaac 40

<210> 72  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 72

aggagtaagg agagaagagt gaggagtaca cctcaccta

40

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Desulfuromonas chloroethenica

&lt;400&gt; 73

agtaaggaga gaagagtgag gagtacacct caccctaacg

40

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Desulfuromonas chloroethenica

&lt;400&gt; 74

gacacgcgaa ggtagcaaca cgatcgctta agtagaagac

40

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acetobacterium woodii

&lt;400&gt; 75

ttaacgggac aaataccgga gtagtggttag caggtcccaa

40

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acetobacterium woodii

&lt;400&gt; 76

ccggagtagt ggtagcaggt cccaatcgat cattgaaaac

40

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acetobacterium woodii

&lt;400&gt; 77

gacaaatacc ggagtagtgg tagcaggtcc caatcgatca

40

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 40

<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 78  
ttttaacggg acaaataccg gagtagtggt agcaggtccc 40

<210> 79  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 79  
tttaacggga caaataccgg agtagtggtg gcaggtccca 40

<210> 80  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 80  
aaggtcaaga tataaagggc atacggtgga tgccttggcg 40

<210> 81  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 81  
gaaggtcaag atataaaggg catacgtggt atgccttggc 40

<210> 82  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 82  
aagatataaa gggcatacgg tggatgcctt ggcgccaaga 40

<210> 83  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 83  
gcgcgtggca aatttgaact taggagcatc tatgctccgt 40

<210> 84  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 84  
tcaagatata aagggcatac ggtggatgcc ttggcgccaa 40

<210> 85  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 85  
tcgcgcgtgg caaatitgaa cttaggagca tctatgctcc 40

<210> 86  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 86  
cgcgtggcaa atttgaactt aggagcatct atgctccgtc 40

<210> 87  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 87  
gtccacctag gccaccata aaagattgat attgtggggg 40

<210> 88  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 88  
agattgatat tgtgggggta tagctcagct gggagagcac 40

<210> 89  
<211> 40  
<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 89

attgatattg tgggggtata gctcagctgg gagagcacct

40

<210> 90

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 90

agagacttct gaaagccgaa gaggcaaac ggagcaatcc

40

<210> 91

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 91

gacttctgaa agccgaagag gcaaaacgga gcaatccgta

40

<210> 92

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 92

atgcgaattg ataacgtggg ggtgtagctc agttgggaga

40

<210> 93

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 93

ggataagcac cgatatgctt cggggagtcg caaatagaca

40

<210> 94

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 94

gatatgcttc ggggagtcgc aaatagacat tgatccggag

40



<210> 95  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 95  
gcaccgatat gcttcgggga gtcgcaaata gacattgatc 40

<210> 96  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 96  
gcactgtgaa atgcgaattg ataacgtggg ggtgtagctc 40

<210> 97  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 97  
gtcagttgtt aaggatcaag aaatgaaggg cacagggcgg 40

<210> 98  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 98  
gttggttaagg atcaagaaat gaagggcaca gggcggtatgc 40

<210> 99  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 99  
ttgttaagga tcaagaaatg aagggcacag ggcggatgcc 40

<210> 100  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 100  
gattgtcaaa gaactgggtgg aggtgaacgg attcgaaccg 40

<210> 101  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 101  
cgattgtcaa agaactgggtg gaggtgaacg gattcgaacc 40

<210> 102  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 102  
gtcaacctct cagaactgaa tagcagatgt gtgcgttcgg 40

<210> 103  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 103  
taaccgaact gagctatagg cccgaagccg ttatcgtaa 40

<210> 104  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 104  
cgtcaacctc tcagaactga atagcagatg tgtgcgttcg 40

<210> 105  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 105  
ccgaagccgt tatcgtaac ctctcagaac tgaatagcag 40

<210> 106  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 106  
tgagcaaaat atacaccgcc acgagggcat tgtttgggct 40

<210> 107  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 107  
ttatcaatcg ggccattagc tcagctgggt agagcgcagt 40

<210> 108  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 108  
cgtcacgtca tgaaagccgg taacacttga agtcgatgtg 40

<210> 109  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 109  
gccgcggtaa tacgtaggaa gcaagcggtta tccggattta 40

<210> 110  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 110  
attttgggct gaaggacttg cgctaagcgt cctgtttgct 40

<210> 111  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 111  
ctggatcacc tcctttctaa ggataattgg cctcgtgcct

40

<210> 112  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 112  
gtccttggtt cgagaccaag atggcccacc ataaagctaa

40

<210> 113  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 113  
ggactggtaa ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgta

40

<210> 114  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 114  
tgttttggtta agtcctgcaa cgagcgcaac ccttggtgct

40

<210> 115  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 115  
gtcctgataa gactgaggtc cttggttcga gaccaagatg

40

<210> 116  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sense primer 27F for PCR

<400> 116  
agagtttgat cctggctcag

20

<210> 117  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Antisense primer 132R for PCR

<400> 117  
gggttbcccc attcrg

16

<210> 118  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Antisense primer 341R for PCR

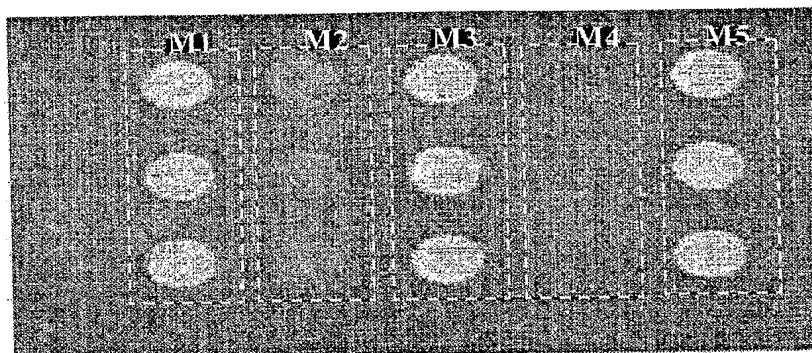
<400> 118  
caatgaccac aatttaaggg

20

【書類名】 図面

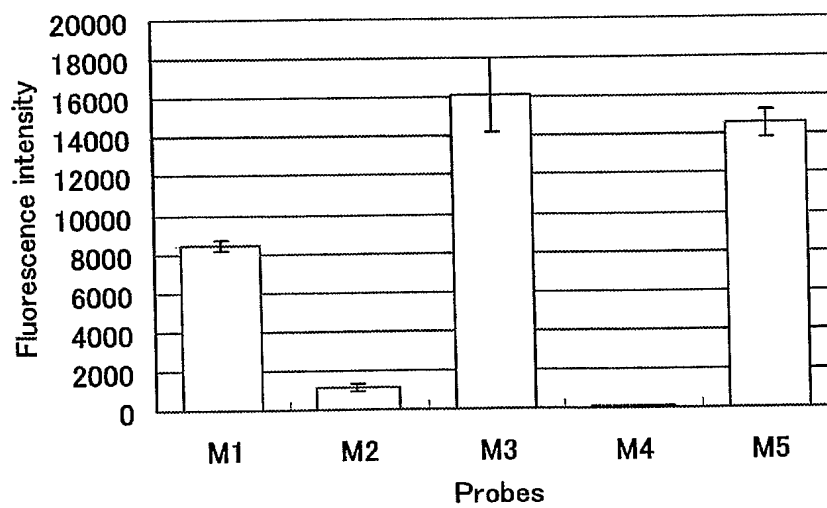
【図 1】

A

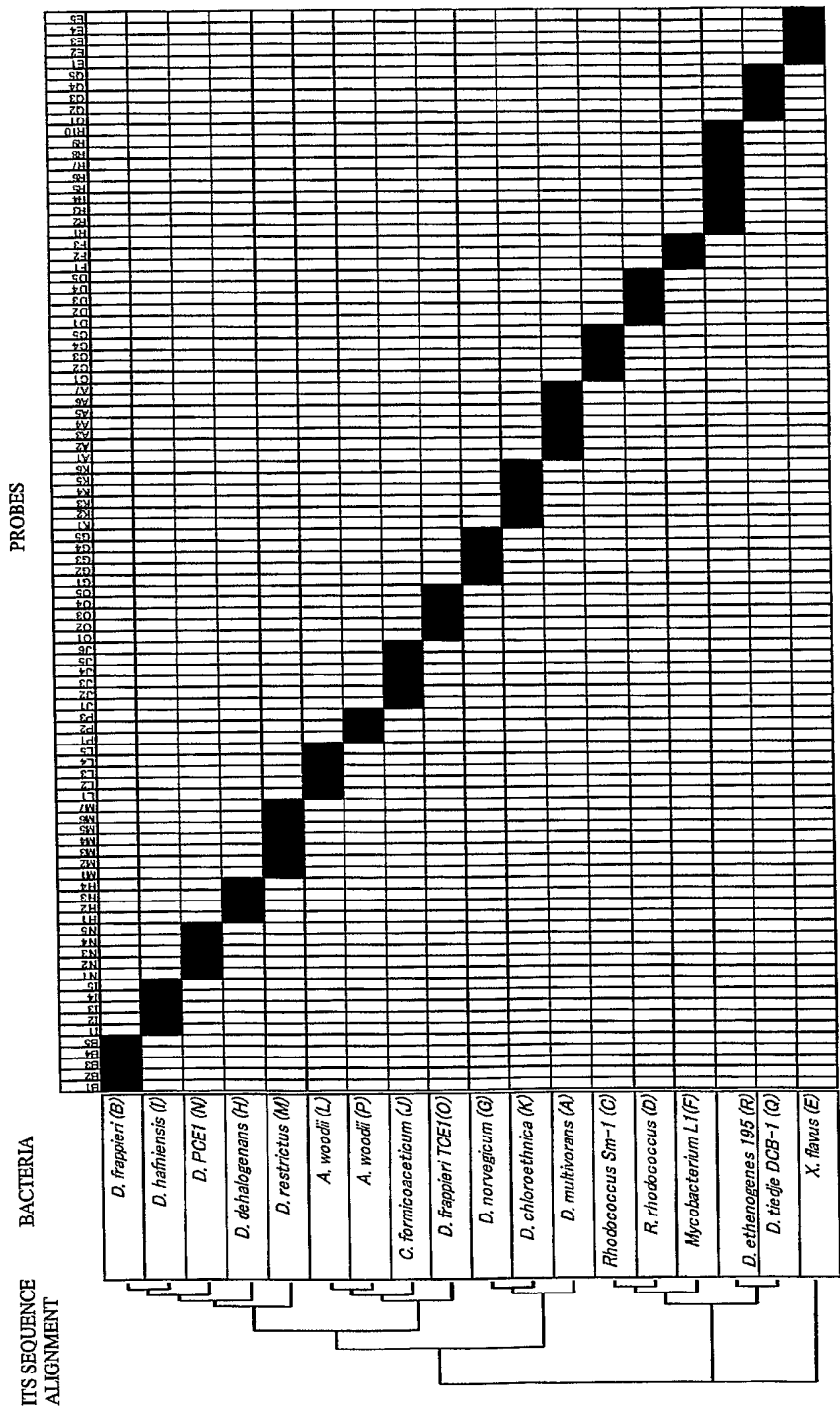


B

Contaminated soil sample hybridization

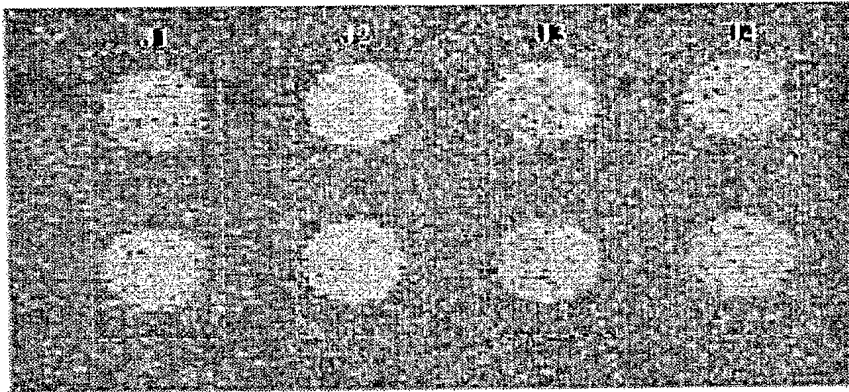


【図 2】

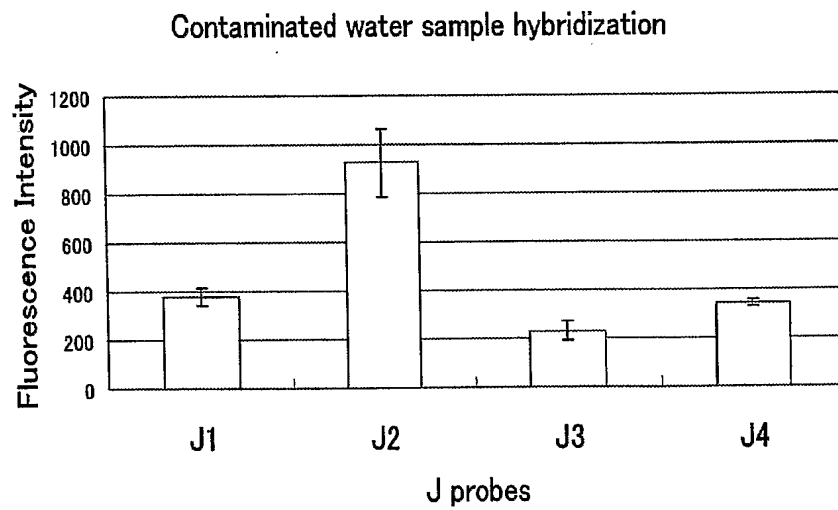


【図 3】

A



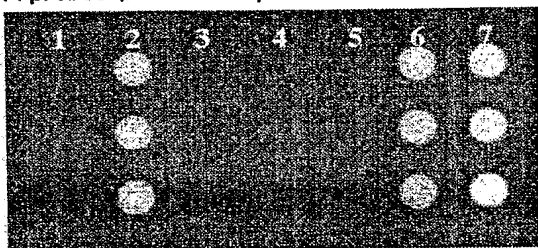
B



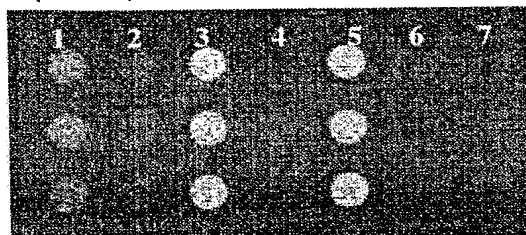


【図 4】

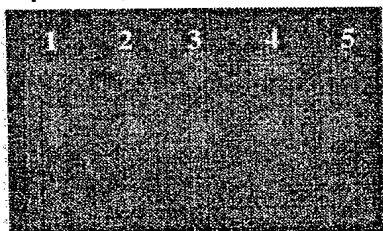
A probes (for *Dehalospirillum multivorans*)



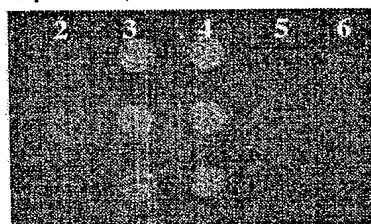
M probes (for *Dehalobacter restrictus*)



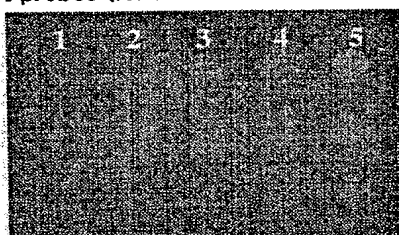
B probes (for *Desulfitobacterium frappieri*)



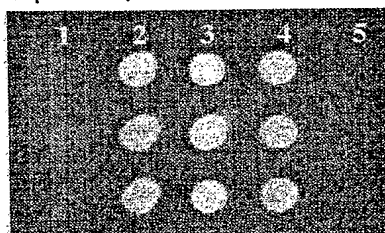
N probes (for *Desulfitobacterium* PCE1)



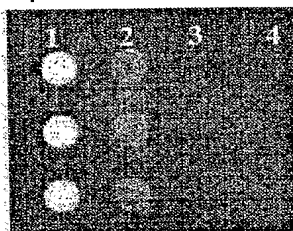
I probes (for *Desulfitobacterium hafniense*)



O probes (for *Desulfitobacterium frappieri* TCE1)

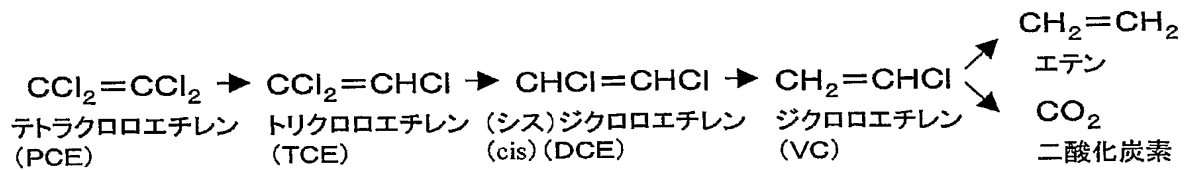


J probes (for *Clostridium formicoaceticum*)



【図 5】

A



B

<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195 R	PCE → TCE → DCE → VC → ethene
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> B	PCE → TCE → cisDCE
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> I	
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> H	
<i>Desulfitobacterium</i> sp. strain PCE1 N	
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> TCE1 O	
<i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1 Q	
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> K	PCE → TCE → DCE
<i>Acetobacterium woodii</i> L	PCE → TCE
<i>Acetobacterium woodii</i> P	
<i>Clostridium formicoaceticum</i> J	PCE → TCE
<i>Dehalobacter restrictus</i> M	PCE → cisDCE
<i>Dehalospirillum multivorans</i> A	PCE → cisDCE
<i>Desulfomicrobium norvegicum</i> G	PCE → cisDCE
<i>Rhodococcus</i> sp. Sm-1 C	DEC, VC → CO <sub>2</sub>
<i>Rhodococcus rhodococcus</i> D	
<i>Xanthobacter flavus</i> E	DCE, VC → CO <sub>2</sub>
<i>Mycobacterium</i> L1 F	VC → CO <sub>2</sub>

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 汚染環境中に存在する微生物の汚染物質分解能力を迅速に判定できる方法の提供を目的とする。

【解決手段】 前記目的を達成するために、本発明の環境の生物活性判定方法は、テトラクロロエチレン（PCE）およびトリクロロエチレン（TCE）の少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境の生物活性判定方法であって、環境試料から抽出した核酸を遺伝子増幅方法により増幅してターゲットとし、前記ターゲットを前記有機塩素化合物の分解関連バクテリアに特有の塩基配列からなるDNAプローブの少なくとも1つとハイブリダイズさせることで前記環境中の前記バクテリアを検出し、検出された前記バクテリアの前記有機塩素化合物およびその脱塩素化物に対する分解能力に基づき、前記環境の前記有機塩素化合物の除去能力を判定することを特徴とする。

【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)  
 【提出日】 平成16年 6月 3日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【事件の表示】  
     【出願番号】 特願2004- 50083  
 【承継人】  
     【識別番号】 304019399  
     【住所又は居所】 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1  
     【氏名又は名称】 国立大学法人岐阜大学  
     【代表者】 学長 黒木登志夫  
     【連絡先】 部署名 学術情報部 産学連携課 担当者 知的財産係長 武田  
                   正 電話番号 058-293-2088 (ダイヤルイン)  
 【その他】 15文科会第1999号に基づく承継

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 1 0 1 2 2 5 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 1 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

氏 名

岐阜大学長

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 1 2 6 1 3 3 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 3 月 2 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府吹田市垂水町 3 丁目 2 8 番 3 3 号

氏 名

松下環境空調エンジニアリング株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 4 0 1 9 3 9 9 ]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 4 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

岐阜県岐阜市柳戸1番1

氏 名

国立大学法人岐阜大学